組織培養在園藝育種上之應用

陳　文　輝
台灣糖業研究所

前　言

傳統雜交育種是過去數十年來作物育種之主流，對改良作物產量及品質之貢獻極大。但雜交育種在年年重複地使用有限的親本下，使優良因子之組合能力達到最高極限。因此獲得優良後代之機會逐年減少。爲了繼續提高產量及改善品質，必須擴大引用遠緣遺傳材料。但遠緣親本多具有雜交不親和性，不易達成雜交目的。克服此不親和性，可藉助於新的生物技術，如試管內授粉、幼胚培養或原生質體融合等。

上述新育種技術中，以原生質體(protoplast)之融合，爲最有可能擴大遺傳質變異及克服遠緣植物雜交不親和性。原生質體係除掉細胞壁之單細胞。1970年後，許多種植物都能從幼嫩組織或培養細胞獲得大量活性原生質體，進而培養再生植株，成功的例子包括菸草雙倍體、菸草單倍體、雜種矮牽牛、胡蘿蔔、曼陀羅、油菜、蘆筍、番茄、珍珠粟等。因此這種技術已受到各國生物學家的重視，其研究範圍日漸擴大，方法亦日新月異，例如利用植物原生質體吸取固氮菌或具有固氮能力之藍綠藻，期使非豆科作物具有固氮功能；利用原生質體吸收已經分離出的 DNA、染色體、細胞核或葉綠體，達成器官轉移或遺傳轉形作用；利用原生質體融合與培養，培育菸草種間雜種植物。

最近幾年來，體細胞雜交育種在雙子葉植物已有一些突破性發展，兩種不能行有性雜交的遠緣植物，經原生質體融合、培養，已有數種能獲得雜種細胞，甚至育成雜種植物，如 *Lycopersicon esculentum* + *Solanum tuberosum*；*Arabidopsis* + *Brassica*； *Aezopodium* + *Daucus*；*Datura* + *Atropa*。遺憾地，在重要的單子葉作物，除少數原生質體可培養外 (但培養成功率低)，其餘未有進展，有待加强研究。

原生質體之分離

分離原生質體的方法一般有兩種：(一)機械法 － 將組織放於高張溶液使細胞發生原生質萎縮，再用刀切開細胞壁使原生質體釋出；(二)酵素法 －利用纖維酵素(cellulase)和半纖維酵素(hemicellulase) 在略高張溶液裡分解細胞壁，獲得原生質體。因爲酵素法分離原生質體量多，細胞活性受滲透壓收縮影響較少，而且不像機械法易損傷多數細胞。所以，目前普遍採用酵素法分離原生質體。但是機械法雖古老而分離量少，仍有其優點，例如能避免因添加酵素所招致之細

胞構造及代謝之傷害。因此偶而有些學者也聯合兩種方法以分離原生質體。

一、機械法分離原生質體

Klercker於1892年首先利用此法自絲狀藻(*Vaucheria*)和水戰士(*Stratistes aloides*) 獲得原生質體，可是一直未引起生物學家的注意。1931年，Chambers and Höfler 將洋蔥鱗片之上表皮浸在 1M 蔗糖溶液，當原生質體縮離細胞壁時，用銳刀割上表皮，分離少數原生質體。此法分離之原生質體所得之量雖少，但已用來研究一些細胞生理問題，如研究植物裸體細胞之擴張能力，黴菌毒素對原生質絲(plasmodesmata)之影響；植物生長素對原生質絲之影響及滲透壓與植物細胞活力之關係。

二、酵素法分離原生質體

1960年英國 Cocking以酵素分解高等植物根尖細胞之細胞壁而獲得多量活性原生質體，開創植物單細胞培養新紀元。迄今，原生質體可自多種植物之各種器官和組織獲得，如根部、莖頂、葉片、花瓣、花粉母細胞及花粉粒、果肉、芽鞘(coleoptile)、胚乳、種子糊粉層、體胚、腫瘤組織、根瘤、癒合組織及懸浮培養細胞等。

一般分離原生質體較好的材料是展開之嫩葉片，但葉齡及植物生長環境如光、溫度、土壤肥力及濕度等也常影響原生質體分離量、性質及活力。由於組織材料本身之生理狀態嚴重地影響原生質體之分離，一般都將植株培養於溫濕度控制良好的生長箱或溫室。較適當的光強度在 0.3～1.0 $W \cdot cm^{-2}$，每天給予16～18小時照光，6～8 小時黑暗之光週期最爲普遍。有時，在分離原生質體前，將材料經24～72小時暗處理，以減少組織裡澱粉粒含量，可增加原生質體分離量。溫濕度一般控制在能使植物迅速生長時爲最適當。多施肥料特別是氮肥，使組織更易分離原生質體。

癒合組織及懸浮培養細胞亦常被用來分離原生質體。癒合組織生長於固體培養基，一般生長較懸浮細胞慢，而且組織裡含有各種不同形狀及生理狀態的細胞，故較不適於分離原生質體。懸浮培養細胞一旦建立，生長迅速，每24～30小時分裂一次，若每隔3至4天移植一次，可維持細胞最高生長率及生長一致的細胞群。利用生長旺盛初期的懸浮細胞可分離多量活性原生質體。但是新建立的液體培養細胞，含有各種不同大小、年齡甚至死亡的細胞，所以也不容易分離到原生質體。

1.酵素液組成

分離原生質體的酵素有三大類：纖維酵素(cellulase)，半纖維酵素(hemicellulase)及果膠酵素(pectinase)。常用的商品酵素及其廠商簡略列於表一，其他尚有glusulase、pectolyase、y23 等。這些商品酵素並非完全純化，常含有蛋白酵素，磷酯分解酵素及核酸分解酵素等。這些不純物可能損傷原生質體。因此，一般常用 sephadex 凝脂柱純化，可除去酵素中的酚類及核酸分解酵素等不純物質，因而改善原生質體活性。

表 1.分離原生質體常用之酵素

Table 1. Enzymes commonly used for protoplast isolation

酵素 Enzyme	供應廠商 Commercial source
Onozuka R10, cellulase	Kinki Yakult Biochemical, Nishinomiya, Japan
Cellulysin, cellulase	Calbiochem, San Diego, Ca., U. S. A.
Driselase, cellulase	Kyowa Hakko Kogyo Co., Tokyo, Japan
Macerozyme R10, pectinase	Kinki Yakult Biochemical Nishinomiya, Japan
Pectinase	Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U. S. A.
Rhozyme HP-150, hemicellulase	Rohm and Haas Co., Philadelphia, Pa., U. S. A.

酵素液的組成及濃度皆可影響原生質體的分離量。一般酵素液除酵素外，尚含有滲透壓穩定劑(osmoticum)酸鹼度緩衝劑，一些鹽類或培養基。2～6 mM 鈣鹽是必須成分，0.5～2 mM磷酸鹽可保存原生質體的活力，最常使用之滲透壓穩定劑是甘露醇(mannitol)及花楸醇(sorbitol)，葡萄糖和蔗糖，後兩者可能作生長能源，較適當的滲透壓穩定劑的濃度約在 0.3～0.7 M。

酵素液之酸鹼度亦很重要，pH值在5～6間的微酸性液較適當，分離甘蔗懸浮培養細胞之原生質體以pH 4 最適當，一般用3 mM 磷酸鹽或 MES (2(n-morpholino) ethanesulfonic acid)作緩衝劑穩定酵素液的酸鹼度。

2.原生質體分離步驟

常用之原生質體分離步驟有兩種：間接法和直接法。間接法是先將組織放於果膠酵素液分離單細胞，再用纖維酵素液除去單細胞之細胞壁，便形成原生質體。直接法則將組織放在同時含有纖維酵素和果膠酵素的酵素液裡分離原生質體。直接法分離原生質體比較簡便，但鄰近原生質體在分離過程中易發生融合，因而產生一些多核原生質體。

植物組織常切成 1mm 大小再放在盛有酵素混合液的三角瓶(50 ml)或培養皿(5cm寬 X 1cm深) 內。葉片組織切碎前最好去除下表皮或用刷子擦傷下表皮細胞，便利酵素液侵入組織內，最後將培養容器移在25～30℃定溫箱作慢速搖盪(30～60 rpm)，並利用倒立顯微鏡定時觀察原生質體之分出量。當原生質體分出量最多時(約經酵素處理2～18小時)，利用30～80 μm濾網除去未分離之組織片，再用低速離心法(50～100 X g，5～10分鐘)收集原生質體，並以培養液清洗三次後，再進一步作培養。由葉片分離之原生質體含有許多大小相若的雜質，可用離心配合濃稠蔗糖漂浮法或 Ficoll 400(pharmacia fine chemicals)溶液漂浮法等技術加以純化後，再作培養。

原生質體之培養

原生質體可懸浮培養於液體培養基或平板培養於洋菜培養基裡，假使原生質體分離量少，亦可作小量懸滴培養或小室培養，但微量培養之器皿必須放在有濕氣的容器裡，培養液才不致於乾涸。洋菜平板培養法最早用於培養菸草懸浮細胞。1971年 Nagata and Takebe仿照此法培養菸草原生質體獲得許多細胞系，以顯微鏡檢查有60％以上原生質體呈現分裂生長之跡象。液體培養之原生質體再生細胞壁，開始分裂後，需定期逐漸加入減滲透壓之培養基或移放在洋菜培養基上才易於繼續分裂生長。

一、培養基組成

原生質體生長所需之營養常與細胞培養之培養基相似，其培養基組成包括(1)無機鹽類，(2)碳源，(3)維他命，(4)有機氮源，(5)生長調節素和 (6)滲透壓穩定劑。pH 值則調在5.5～5.8間。前述五項組成大都以 Murashige and Skoog 培養基及 Gamborg 等人之 B_5 培養基稍加修改而成。鈣濃度常增加到 4～6 mM。碳源以葡萄糖較合適，偶而亦加入1～3 mM 戊醛醣(ribose)等五碳醣。加入 0.01～0.25％水解酪蛋白(casein hydrolysate)；1～5 mM 麩胺酸(L-gluta-mine)或 1～5％(v/v)椰子汁有助原生質體之分裂生長。

原生質體缺乏植物細胞壁，故培養基需加 0.35～0.7M 滲透壓穩定劑，才能培養成功。甘露醇(mannitol)和花楸醇(sorbitol)是常用的穩定劑，可單獨使用或兩者混合使用。葡萄糖或無機鹽如氯化鈣亦被用作滲透壓穩定劑，兼供原生質體營養。

二、培養條件與環境

原生質體較適當培養溫度是22～28℃，依材料不同而異。照光並非絕對需要，但給予 2,000 lux 照光有害原生質體生長。另一影響原生質體生長的重要因素是開始培養之細胞密度，一般每毫升要有 10^4 到 10^6個細胞才易培養成功，但是利用適宜之培養基亦可使少數融合後之菸草原生質體分裂生長或利用細胞餵養技術(feeder-cell technique)可使每毫升5～50個菸草原生質體(每個6公分培養皿有60～100個原生質體) 分裂生長，甚至再生植株。

三、細胞壁之再生

原生質體培養於適當培養基數小時內即開始生成細胞壁，但生成完整細胞壁可能費時2～7天，新生細胞壁可用原生質萎縮法或 1％Calcofluor White 螢光染色法辨認，但是比較可靠的方法是冷凍蝕刻(freeze etching)和表面複製(surface replica)等電子顯微鏡技術。利用這些新技術證實原生質體培養數小時內，即有細胞壁構成物質堆積在原生質膜上。然後逐漸形成微纖維絲(microfibrils)。並知細胞壁生成特性因植物種類及材料部位不同而異，因而使原生質體成爲絕好材料去作細胞壁早期合成及瞭解何種細胞器控制細胞壁合成之生理研究。

四、分裂生長與再生植株

已有多種植物之原生質體可分裂生長，甚至再生植株。適當的培養基、培養環境及培養條件

皆是原生質體分裂生長之重要因子。一般認爲原生質體再生細胞壁後才進行分裂生長，但 Hellmann and Reinert 發現胡蘿蔔原生質體未再生細胞壁即可進行核分裂、甚至進行數次沒有細胞質分裂之核分裂，因而產生多核細胞。另外亦發現*Haplopappus*和*Convoloulus*屬原生質體再生細胞壁後，只進行一至二次核分裂而無細胞質分裂。這些現象可能是由於不純酵素或高滲透壓培養基所導致。

原生質體分裂1～3次後，若繼續維持在高滲透壓培養基裡，其生長將減慢或完全停止。若繼續加入遞減滲透壓之培養液，則可繼續分裂生長成懸浮培養細胞或癒合組織，然後利用一般組織培養方法誘發癒合組織再生植株。

迄今原生質體能再生植株者，只限於少數幾科植物，如茄科之菸草、別喇敦那(*Atropa belladonna*)、馬鈴薯、番茄、野生番茄(*Lycopersicon peruvianum*)、茄子、辣椒、曼陀羅及矮牽牛；菊科之萵苣；十字科之油菜、花椰菜、甘藍；瓜科之胡瓜；禾本科之珍珠粟及大黍；豆科之紫苜蓿；百合科之蘆筍；毛茛科之石龍芮；芸香科之橘子及甜橙；玄參科之毛地黃類；繖形花科之胡蘿蔔。綜合而言，茄科植物似乎較容易再生植株，但關係人類糧食的豆科和禾本科，仍舊很難再生植株，有待專家學者繼續努力探求最適當培養液及培養條件。

原生質體之突變誘導及再生植株之變異

原生質體經培養可再生植株，使微生物突變育種那套完整的技術，可應用於高等植物作品種改良，例如利用 N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoquanidine 處理菲沃斯 (*Hyoscyamus muticus*)單倍體葉原生質體，因而獲得缺乏硝酸鹽還原酵素之突變體及需求 histidine和 tryptophan 之營養要求細胞系(auxotroph) 。另以BUdR 處理菲沃斯原生質體，亦獲得一個需求 histidine之營養要求細胞系，並已分化生成許多芽體。由菸草葉片原生質體選育抵抗 ρ - Fluorophenylalanine(PFP)植株亦獲成功。

從原生質體再生之植株，由於種類及再生的數量不多，很少注意其是否發生變異，初期一直認爲再生植物與原種沒有差異；1980年 Shepard 等人自馬鈴薯栽培種Russet Burbank葉片原生質體再生許多植株中，發現一些重要農藝性狀的突變體，如抗晚疫(late blight)病等，稱爲protoclones，目前正在田間做進一步觀察。最近Thomas等人亦自馬鈴薯栽培種 "Maris Bard"及"Majestic"葉片原生質體再生許多植株，調查10種形態特性，發現自" Maris Bard"來之 protoclone，每株皆與原種不同，相反地，自"Majestic"來之protoclone皆與原種相同，詳細追蹤分析植株變異之起因，認爲植株變異是由於原生質體生成之癒合組織在繼代培養時發生，此即類似一般癒合組織培養之變異現象。

Barbier and Dulieu 亦發現從異質體(hetrozygous)菸草之葉片或子葉原生質體培養分化之植株，有 9.6% 變異體，詳細研究原生質體培養期那一階段較易發生變異，獲知在原生質體分裂生長成細胞團的階段，最易發生變異。另外，Prat 調查172株由同質二倍體菸草之葉片原生質體再生植株間之變異，發現有 100 株是多倍體(一般是四倍體而未發現有非整數倍體植株)。二倍體植株之形態與原種雖然相若，但從其自交後裔又可發現外表型相異之突變體，如白苗、晚開花及雄不孕等特性。

原生質體之融合與體細胞雜交

一、原生質體融合

原生質體缺乏細胞壁，所以在自然狀況下，鄰近細胞由於原生質絲的連接，在細胞壁溶蝕過程中，亦會發生同種原生質體間自然融合的現象。這些多核原生質體的細胞核可能在細胞分裂前，分裂中或分裂後融合成一個核體細胞 (synkaryon)。

多種化學和物理方法已證實可促使同類或異類原生質體融合， 如鈣鹽高鹼法， polyethene glycol(PEG)法及電場激融法(electric field pulse)。PEG 配合鈣鹽高鹼清洗法可提高融合率，由於 PEG 分子量高而稠，一般原生質體融合不易在懸浮液裡操作。Power等人使用15%PEG 6,000及Schieder使用含有4.5%PEG 6,000之 0.2 mM $Ca(NO_3)_2$高鹼溶液解決此困難。很多種因素可影響 PEG和鈣鹽融合法。PEG分子量、濃度、處理時間、鈣離子濃度、pH 值大小、原生質體來源及使用分離原生質體的酵素，皆可影響原生質體融合率及雜種細胞之活力。最近發展之電場激融法，促融方式比較溫和，而且可提高兩核雜種細胞的比率及減少融合處理所造成之損傷，可能是未來很好的一種原生質體融合技術。

二、雜種細胞之選育

經由化學或物理方法促融之異核雜種細胞，在適當培養條件下 (單一培養於複雜培養基或褓姆培養) ，能夠分裂生長，繼而再生雜種植物。但是目前使用之融合技術並未有特殊選擇性，兩種不同種源之原生質體經融合處理後，所獲得是非常複雜的原生質體融合群，除了眞正需要的異核融合體外，尙有同核融合體及未融合之原生質體。如何自混雜原生質體融合群中，選育眞正的異核融合體，並培養成雜種細胞群是達成體細胞雜交重要步驟之一。目前有三種選拔法，一爲顯微鏡機械挑選法，另一爲異類細胞生長特性及外表型之基因補償法，第三種爲電場分類法 (cell sorting)。 此法剛在發展中，設備昂貴、繁雜，尙難普遍化。

1.顯微鏡挑選法

Kao 首先成功地在顯微鏡下，用顯微吸管挑出大豆 + 菸草融合體(大豆原生質體爲無色，菸草原生質體有綠色葉綠體)，分別放在許多蜂巢室培養皿內小心培養，獲得 20 個雜種細胞系。最近，有些學者利用同法亦自 *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris* 及*Nicotiana Knightiana* + *N. sylvestris*選育出雜種植物。此技術，只限應用於兩類有顏色差異的原生質體，而且必須已找到原生質體少數細胞的培養條件。最近 Patnaik等人利用此技術配合螢光染色辨認異類融合體，將是極有展望選育雜種細胞的技術。

2.異類細胞的基因補償法

基因補償法始於1972年，Carlson等人利用 *Nicotiana glauca*和 *N. langsdorffii*之細胞必須於含有荷爾蒙之培養基方能生長而其體細胞之雜種細胞可生長於缺乏荷爾蒙培養基之特性，首先成功地選育出體細胞雜種植物，往後採用此法，成功的例子很多，可綜合成下列 8 種方式：

(1) 白苗Ab + 白苗aB選育綠苗野生種 AaBb：成功者有*Nicotiana tabacum* + *N. tabacum*；*N. tabacum* + *N. sylvestris*；*N. tabacum* + *N. rustica*；*N. tabacum* + *N. glauca*；*Petunia parodii* + *P. hybrida*；*Dutura innoxia* + *Datura innnoxia* 雜種。

(2) 營養要求品系Ab＋營養要求品系aB 選育自營野生雜種AaBb：成功者有同種圓線蕨類雜種(*Sphaerocarpos donnellii* + *Sph. donnellii*)；*Physcomitrella patens* + *Phys.patens* 雜種；*Nicotiana tabacum* + *N. tabacum*雜種。

(3) 抗毒質品系R_1R_2＋抗毒質品系r_1R_2，選育倍加抗毒質 $R_1r_1R_2r_2$ 之雜種：成功者有*Nicotiana sylvestris* + *N. sylvestris*雜種及*Daucus carota* + *D. carota* 雜種。

(4) 能分化白苗品系＋不能分化植株之正常品系，選育能分化並具綠苗的野生雜種：成功者有矮牽牛(*Petunia hybrida*) + *Petunia parodii*；不同種之矮牽牛(Petunia)雜種；不同種之曼陀羅(Datura)雜種；胡蘿蔔(*Daucus carota*) + *Aegopodium podagraria*；*Daucus carota*＋*Petroselinum hortènse*。

(5) 白苗品系＋綠苗品系，選育綠苗而具有中間外表型特性的雜種：成功者有不同胡蘿蔔(*Daucus*)；番茄(*Lycopericon esculentum*)＋馬鈴薯(*Solanum tuberosum*)，*D.innoxia*＋*Atropabelladonna*；不同種類菸草雜種。

(6) 細胞生長不良但抗藥劑(actinomycin D)＋細胞生長良好但不抗藥劑的品系，(兩品系皆不分化出幼苗)，選育抗藥劑又能分化幼苗的雜種：例如 *Petunia hybrida* + *P. parodii*；不同種類菸草雜種；*N. tabacum*(tumor) + *N. tabacum*。

(7) 利用選擇性培養基淘汰雙親細胞，只允許雜種細胞生長。

(8) 利用兩種野生型植物，選育中間外表型特性雜種或生長旺盛型雜種。

綜觀上述體細胞雜種植物，培養成功者多數屬於雙子葉植物，茄科和十字花科，相對地，關係人類重要食物的穀類及豆類，皆未有進展，需要學者專家繼續努力探討。

三、原生質體電融合之發展

1979年 Senda等首先利用微細玻璃電極使兩個鄰接原生質體融合成一個細胞，接著 Neumann等(1980)發現平行金屬電極也能使原生質體融和；Zimmermann及 Scheurich(1981)引用 Pohl 雙電泳原理 (dielectrophoresis)，先使原生質體在0.1～0.2毫米平行電極上移動排列成珠串，在施於短脈衝直流電，可提高原生質體電融合率，但粘在電極上的原生質體易因脈動受損，而且電極間隔太狹小，容納處理的原生質體量太少(<0.1 ml)。1984年 Watts及 King將電極放寬到5 mm，利用雙極一雙極相吸原理(dipole-dipole attraction)使原生質體在高頻率交流電排列成對，再施用短脈衝高壓直流電，即可使鄰接原生質體發生融合。電融合裝置發展至此，已能有效地處理大量原生質體，並有各式商業產品出售。目前，電融合除被用於植物原生質體外，亦被用於酵母和動物細胞去生成體細胞雜種。

目前市場銷售之電融合儀，皆由高頻率交流電函式波產生器，直流電脈衝產生器和電極室組成，電極室依需要可自行研製，欲利於在倒置顯微鏡觀察調查原生質體電融合率，吾人可剪取 1 mm(dia.)銅線，用 AB膠將兩條銅線平行粘於玻璃載玻片上(1～3 mm寬皆可)。為利於大量原生質體融合和觀察，我們亦可依 NuNC 6 X 4 圓孔 (2 cm dia.)透明膠盤製成圓形銅質電極，正負電極間隔 1～3 mm。無菌操作時，電極浸入95%酒精 2～5 分鐘後，取出在無菌操作箱裡晾乾即可。臺糖研究所園藝系組織培養研究室，依據 Watts 和 King (1984) 電融合原理，亦自行組合一套電融合儀，只花費新臺幣 5,000元購一台臺製函式波產生器；一萬元研製電極室，一萬購買電

子零件組合脈衝控制器(0.25～3.00毫秒)配置於實驗室常備之直流供電器(0～500伏特)。此電融合儀可使60%以上鄰接原生質體在 5 分鐘裡完成融合過程。

經由電融合生成的雜種細胞已能分裂生長並再生植株，所有這些材料皆屬於茄科，包括五種菸草屬 (*Nicotiana* spp.)及兩種茄屬 (*Solanum* spp.)。Bates 等(1983)首先報導菸草與*N. plumbaginifolia* 電融合雜種細胞能生成癒合組織，並再生雜種植株。Puite等(1985)自*N. plumbaginifolia* 兩種缺硝酸還原酶突變種原生質體電融合雜種細胞培育出含有硝酸還原酶的雜種植株。在 *N. glauca*和*N. langsdorffii*電融合試驗裡，約可獲得0.2%體細胞雜種植物，類似實驗，Chapel等(1986)獲得0.14%雜種植物，這些雜種植物可生長到開花結果。

Puite等(1986)首先報導馬鈴薯與 *S. phureza* 電融合雜種細胞能再生植株，核型及DNA含量分析皆証實其爲雜種植株，進一步分析，Pigihacker等(1987)發現某些特殊染色體並不存在於雜種植株裡。此類現象與經由Polyethylene glycol (PEG)促融所得的體細胞雜種植物相似。

雖然Marikawa等(1986,1987)採用高密度多層(約50層)原生質體方式；Chapel 等(1984,1986)以添加 spermine 和 PEG 在電融合液方式使原生質體接觸，以利於原生質體電融合進行，但是多數人仍應用高頻率(0.6～1.5 MHZ)交流電(150～400 V/cm)使原生質體排列成對或成串，以提高原生質體電融合率。

不論電容器放電式或者方形波脈衝皆能促使鄰接原生質體發生融合，一般直流電場變化不大，電壓從1000到3000 V/cm；脈衝使用50到300微秒及單一脈衝即達融合目的。0.4～0.6M mannitol是常用電融合液。電融合液裡添加0.1～2.5 mM 鈣離子、鎂離子或0.75～1.0 mM Spermine皆可增加原生質體電融合率及穩定融合原生質體之活力。但電融合液裡含有陽離子，增加電導度而致延遲原生質體的排列。最近，Marikawa等(1988)及 Chen and Tsai(1988)進一步報導電融合液之水勢能及密度皆能影響原生質體電融合率。Ruzin 及 Mc-Carthy(1986)發現原生質體經蛋白酶如profease 或prohase處理後，亦可提高原生質體電融合率。以上這些報導顯示，改變原生質體細胞膜表面構造可影響細胞電融合過程。

體細胞雜種品系之遺傳變異

經由原生質體融合選育之雜種細胞可再生植株，已大大增加利用體細胞雜交改良作物的潛能。前段已述，不論種間或屬間植物皆可獲得體細胞雜種植物，調查分析這些雜種植株之遺傳變異，發現其外表型或基因型變異常大於有性雜交之雜種。其變異包括染色體數，植株形態特徵及基因的直接表現。

一、染色體之變異

由於原生質體融合沒有特異性，加上選育雜種細胞的方法不一，因此體細胞雜種之染色體數變異極大(表二)。早期的研究一直認爲經由原生質體融合培育之植物將爲複二元體(amphidiploid)，1976年 Smith等再作 *Nicotiana glauca* (2n=24)與*N. langsdorffii* (2n=18)之原生質體融合實驗，培育23個雜種植株作細胞學分析，發現雜種之體細胞染色體數：56條者有 4株；57條者有 2株；58條者有 3株；60條者有10株；62條者有 1株；63條者有 2株；64條者有 1株。各株雜種花粉母細胞之染色體配對情形良好，皆有28對以上，所以各植株有60%以上之花粉稔實率。

往後在種間體細胞雜交所獲得的雜種植株，其染色體數之變異亦大如*Petunia hybrida* (2n=14)+ *P. parodii* (2n=14)雜種之染色體對是 24～28條；*Daucus carota* (2n=18)+ *D. capillifolius* (2n=18) 雜種之染色體數是34～54條。在屬間體細胞雜交所培育之雜種植株，其染色體數呈不規則變異，常因選用之親本種類不同而異。如 *Daucus carota* (2n=18)+ *Aegopodium podagraria*(2n=42)雜種之染色體數只有18條；*Arabidopsis thaliana* (2n=40)+*Brassica campestris* (2n=20)雜種是35～45條；*Datura innoxia*(2n=24) + *Atropa belladonna*(2n=72)雜種是84～175條；*Solanum tuberosum dihaploid cell lines*(2n=24)+ *Lycopersicon esculentum* (2n=24)雜種10株，染色體數2n=72者只有1株，其餘皆爲50～54條。1983年Shepard 等人(180)再以馬鈴薯"protoclone 774"(2n=48)與番茄"Rutgers"栽培種 (2n=24) 或"Nova"栽培種(2n=24)作體細胞雜交，馬鈴薯"protoclone 774"+ 番茄"Rutgers"雜種之染色體數爲72條，而馬鈴薯"protoclone 774"+番茄"Nova"雜種爲62～72條。

表 2. 體細胞雜種植株之染色體數變異
Table 2. Variations in chromosome numbers observed in somatic hybrid plants

親代品種及具體染色體數 Parental species and their chromosome no.(2n)	雜種植株染色體數 Hybrid plant of chromosome no.	引用文獻 Reference
Nicotiana glauca (24) + *N. langsdorffii* (18)	55 - 64	1之185
N. tabacum(48) + *N. sylvestris*(24)	76 - 80	1之217
Petunia hybrida(14) + *P. parodii*(14)	24 - 28	1之158
Datura innoxia(24) + *Atropa belladonna*(72)	84 -175	1之117
Daucus carota(18) + *D. capillifolius*(18)	34 - 54	1之 50
D. carota(18) + *Aegopodium podagraria*(42)	18	1之 49
Arabidopsis thaliana(40) + *Brassica compestris*(20)	35 - 45	1之 92
Solanum tuberosum(24) + *Lycopersicon esculentum*(24)	50 - 72	1之129

由上面數例體細胞雜種染色體數之變異情形，可推想經由原生質體融合培育出來的雜種，其染色體數並非兩親之染色體數之和，常常是丟失或增加數條染色體，甚至只保存其中一個親本的染色體，或者保有其中一個親本雙倍的染色體數，這些變化並無規則，受材料、雜種細胞選拔方法及培養方法等等影響甚大。

二、形態之變異

體細胞雜種大多數能定量的形態特徵都介於兩種親代之間，如*Nicotiana tabacum* + *N.glauca*雜種之葉形、葉片大小、葉柄長度及葉面毛茸密度，甚至花形、花色、花冠大小和花構造都屬於兩親代之中間型。其他種間或屬間雜種亦可在植株高度、塊根形態、莖徑、葉面毛茸長度、小花柄長度，及株型等發現中間型特性。以上這些形態受多少遺傳基因控制，大都不明，但由於體細

胞雜種表現中間型特性來看，我們可推想這些形態特徵都由多基因控制。

除了上述中間型之形態表現外，我們亦可發現某些單一親本獨有的形態特徵表現於體細胞雜種，如*Nicotiana*種間雜種之莖花青素；*Datura*種間雜種之莖葉面軟毛和花萼形狀。

三、基因直接表現

體細胞雜種形態中間型表現雖可用來作鑑別雜種之依據，但由於未經融合之原生質體所再生植株亦有一些形態變異，因而降低此依據之可靠性。若能直接分析葉綠體DNA、粒腺體DNA或這些DNA與核DNA所表現之分子標記即可比較進一步了解兩種親代遺傳基因在體細胞雜種之組合情形。

利用膠體電泳分離解析經核酸限制酶分解之番茄 + 馬鈴薯雜種之葉綠體DNA，發現兩個雜種之核外DNA都屬於馬鈴薯，分析葉綠體DNA控制之 Ribulose-1，5-bisphosphate carboxylase (RuBPCase)酵素分子中分子量大之「次單位蛋白質」(large subunit)，亦顯示雜種只有馬鈴薯或番茄所專屬的大「次單位蛋白質」。分析核DNA所控制之 RuBPCase 酵素分子中分子量較小之「次單位蛋白質」(small subunit) ，則顯示雜種同時含有馬鈴薯和番茄之小「次單位蛋白質」。Kumar等亦利用核酸限制酶解析矮牽牛體細胞雜種之葉綠體 DNA；Uchimiya 等曾利用核醣體 RNA 探測菸草體細胞雜種核基因存在情形。

粒腺體DNA在體細胞雜種之表現，目前了解不多，Zelcer等人利用原生質體融合曾將菸草CMS line 92 之雄不孕性(粒腺體DNA控制)轉移給 *N. sylvestris*； Izhar and Tabib 亦將 *Petunia hybrida*雄不孕性轉移入*P. axillaris*，並分析兩個細胞質雜種(hybrids)雄不孕性在後代之遺傳行為，發現其F_2及F_3後裔有雄不孕性及雄可孕性兩種，由此資料顯示細胞質雜種同時具有兩親代之細胞質。當雜種進行減數分裂時，細胞質自異質體分離成同質體，同質體配子若逢機組合即可恢復雄可孕性之植株。

體細胞雜種核DNA之表現，除間接影響到形態之改變外，分析雜種細胞之同功酵素(Isoenzyme) 色帶可直接偵測核 DNA的表現，一般體細胞雜種常是兩親同功酵素色帶的總數。曾被應用的有酶酵素 aspartate、氨基移轉酵素、澱粉酵素及過氧化酵素。雖然同功酵素色帶可用來檢定體細胞雜種，但同功酵素色帶常因組織或培養環境不同而變異。因此使用同功酵素色帶型解析雜種要格外小心。

體細胞雜種遺傳之傳遞

體細胞雜種要能與傳統雜交配合，才可在作物改良上發揮作用，例如經由原生質體融合，雖然可獲得抗病的雜種，但是一些減低品質或產量的性質亦一起存在於雜種植株，除去這些不良性狀的方法，需用雜種與栽培種不斷重複回交才可選育吾人所需的品種。

體細胞雜種要有可孕性，才能與優良親代回交。體細胞雜種之花粉稔實性常受親代彼此間血緣的遠近影響。遠緣植物之體細胞雜種之花粉稔實率低，甚至不孕，例如馬鈴薯 + 番茄雜種。種間體細胞雜種之花粉稔實率又比其親代低，Evan等人檢定 5種 *N. tabacum* + *N. nesophila*雜種之花粉萌芽率，最高為46.7% ，最低是12.2% ，進一步作雜交試驗，發現只有最高萌芽率的一種可與親代回交，另一種可以自交，其餘 3種皆為不孕種。

體細胞雜種而為可孕性者不多，因此有關其遺傳分析的報導更少。經由葉綠體突變體互補所

選育的雜種，常被用來作此一研究。利用體細胞雜種自交或與親代回交，其後裔之葉片顏色或 fraction-1 蛋白質之分離情形，皆不能依孟德爾定律或固定的法則去估算。Schieder 自兩種曼陀羅白苗原生質體融合選育的 5株體細胞雜種(四倍體或六倍體)的花藥培育出 64 株二倍體，調查綠苗及白苗數，結果：由六倍體雜種培養出 2株皆綠苗，由四倍體雜種培養出的二倍體，有45株綠苗和17株白苗，這種綠苗與白苗的比例與孟德爾定律相異，並已顯示體細胞雜種花粉母細胞進行減數分裂時各種基因重組的現象。

原生質體直接基因轉移之發展

在1968年Sale及Hamilton報導細菌原生質體或紅血球細胞經直流電場脈衝處理時，他們的細胞膜會失去半滲透性，Auer等(1976)接著發現使用直流電場脈衝能將放射性標示DNA或RNA引入人類紅血球細胞裡，但到1982年，Neumann 等才報導外來基因可經由高壓電場方式移入老鼠 L 細胞，因而改造 L 細胞缺 TK 酶特性。

在植物遺傳工程領域，多數研究藉腫瘤菌(Agrobacterium tumefaciens)達成基因轉移目的。但多數單子葉植物及裸子植物皆非腫瘤菌的寄主，不易藉腫瘤菌將基因移入此類植物。經由原生質體直接吸取DNA方法成爲深具潛力的技術。Davey等(1980)和 Krens等(1982)首先利用化學藥劑如Poly-L-orhithine及PEG處理 Ti質體DNA和原生質體，獲得轉型的牽牛花及菸草植株。Paszkowski等(1984)依 Krens(1982)法亦能將構築於質體的外來基因移入菸草而獲得轉型植株，我們稱這種技術爲直接基因轉移法。利用此法在不易藉腫瘤菌達成基因轉移的禾草如意大利黑麥草、小麥屬、甘蔗及水稻皆能將外來基因移入原生質體，再生癒合組織並表現此基因。

Fromn等(1985,1986)首先報導藉直流電場脈衝法，即所謂電穿孔法(electoporation)亦能將外來基因直接移入原生質體，而獲得轉型癒合組織，Langridge 等(1985)指出胡蘿蔔原生質體藉電穿孔法獲得轉型之癒合組織，可再生植株並能表現Ti質體的基因。利用電穿孔法轉型之菸草植株也具有結實能力。藉電穿孔法所獲得轉型細胞之機遇率約千分之0.22至0.77，很接近利用 PEG 等化學方法的結果。Shillito等(1985)在原生質體電穿孔溶液添加 8～22.5%(W/v) PEG 後；再給予直流電場脈衝，可提高菸草轉型率。

最常使用於直接基因轉移技術的標示基因是來自 Tn 5 質體之抗生素如 Neomycin，Kanamycin或 G 418 基因 (NPT Ⅱ)，來自 Tn 9 質體之抗 chloramphenicol基因 (CAT) 及 β-glucuronidase 基因(GUS)。這些構造基因尾端常接著 Ti 質體 Opine 合成酶之轉錄停止信息(polyadenylation signal)，前端接著眞核細胞轉錄啓動子(promotor)，可來自 nopaline 合成酶基因，花椰菜嵌紋病毒35S或 19S 基因，胡蘿蔔 phenylalanine ammonialyase酶基因，玉米乙醇去氫酶或 zein 基因，甚至果蠅 copia 啓動子。

用於原生質體直接基因轉移之質體 DNA 型式有線型、單環型、多環捲繞型，質體 DNA 型式對轉型率之影響仍舊說法不一。在以 NPT Ⅱ基因轉型植物的實驗裡，線型 DNA 之菸草轉型率是環型DNA 的2.5至10倍，但 Boston 等(1987)則報導環型 DNA 之胡蘿蔔轉型率卻高於線型 DNA。在以 CAT 基因轉型菸草的實驗裡，兩類型 DNA 所致使的菸草轉型率並無差異。一般認爲就 DNA 分子進入細胞而言，緊密的多環捲繞型 DNA較易通過細胞膜，但就外來基因在細胞內表現或嵌入寄主 DNA 之難易而言，線型 DNA 應該是較好的型式。Werr等 (1986)在以 NPT Ⅱ基因轉型小麥

的實驗裡，發現多環捲繞型 DNA 進入細胞內後，趨於轉變成單環型和線型 DNA，10 天後，在細胞裡只能發現線型 DNA。

一般質體 DNA 之使用濃度約在10到50 μg/ml，過高濃度(>100 μg/ml) 會毒害原生質體活力，質體 DNA常混合 50～100 μg/ml 載體 DNA(如小牛胸腺 DNA) 使用。這些載體 DNA 亦被發現會被嵌入寄主染色體 DNA 裡。

近年來，禾穀作物如水稻、玉米原生質體已能高效率再生植株，再加上原生質體直接基因轉移技術的發展已達成熟階段。因此，這兩種重要穀類作物，藉原生質體直接基因轉移技術，已能將外來基因轉入並再生植株。

原生質體培養在作物改良上之應用與展望

經由原生質體融合可使兩種植物之細胞質和細胞核基因混合並互相轉移，近年來，利用此技術已改造了一些傳統雜交不能育成的種源。目前可能應用於作物改良者有下列數項：

一、解決種間及屬間有性雜交不和的問題，如*Petunia parodii* + *P. parviflora*；番茄 + 馬鈴薯等。

二、利用體細胞雜交選育抗病品種，如抗菸草嵌紋病雜種及抗馬鈴薯X毒素病雜種。

三、利用細胞質雜交(hybrization)，即在原生質體融合前，先用x-ray照射停止單方細胞核活動，然後將其細胞質基因引入於另一種植物。細胞質基因控制的重要性狀包括殺草劑耐性、抗病性、雄不孕性、抗生素抗性及雜種優勢等特性都可利用。利用此技術已成功地將*Solanum nigrum* 抗 Atrazine(殺草劑)特性引入馬鈴薯；將*Nicotiana tabacum* 之雄不孕性引入*N. sylvestris*及*N. glutinosa*；將 *N. tabacunm*抗Tentoxin 性狀引入*N. glauca*及*N. sylvestris*；將*N.tabacum* 抗鏈黴素基因引入*N. knightiana*。

四、利用體細胞雜種做爲重組遠緣基因的橋樑，例如 *Nicotiana repanda* 是抗許多菸草病害的種源，但與栽培種菸草有不親和性，但栽培種菸草(*N. tabacum*)+ *N. nesophila* 雜種 (♀)可與 *N. repanda*有性雜交育成具有三種血統的雜種，做爲抗病種源。

五、經由原生質體融合再生的植株，彼此間有許多差異，顯示原生質體在培養階段，其細胞分裂過程發生染色體及其基因分離重組的現象，例如在馬鈴薯 + 番茄雜種裡，發現有番茄染色體斷片轉座移入馬鈴薯之雜種，此現象有助於直接選育商業性栽培品種。

六、經由原生質體融合將細胞器或重組過的 DNA等有價值的基因導入栽培種，直接選育抗病或具有固氮能力的栽培種。此技術在眞核細胞遺傳工程發展成熟後，必大有作爲。

以上六項應用原生質體培養改良作物的技術，雖然言之振振有詞，但世界上迄今尚未經由此技術育成一個栽培種作物，主要原因在於農業應用有下面數項限制必須克服：

一、原生質體能再生植株者，大多屬於茄科植物，近年來，他科作物如甘藍、珍珠粟、紫苜蓿及甜橙的原生質體雖能再生植株，但供給人類食物最多的穀物及豆類作物，皆不能由原生質體再生植株，有待繼續努力。

二、原生質體經由化學或物理方法促使融合後，包含各種程度的融合體及未融合體，目前大都採用兩種融合細胞之基因補償法篩選雜種細胞，此法需要用突變種作材料，因而不能廣泛應用於所有作物。近三年來，推出電場分類法及顯微鏡挑選法，欲融合之原生質體材料雖可不必受限制

，但電場分類法設備繁雜昂貴，不適合一般使用，顯微鏡挑選法雖一般化，但獲選僅係少數雜種細胞，不易培養。考慮未來體細胞雜交的實用性，建立體細胞雜種普遍化篩選技術仍待努力。

三、體細胞雜種雖具有吾人所需的性狀，如抗病性等因子，但亦移入減低產量或壞品質的基因，所以需要配合回交育種才能選育新品種，但目前由屬間選育的體細胞雜種皆屬不孕性，因而限制這些雜種進一步的利用價值。可能需要採用回交融合(back fusion) 配合胚培養等技術去重組一些具有可孕性的體細胞雜種。

總之，原生質體融合及培養技術會繼續不斷發展成爲改良作物之一種工具。由於原生質體融合可以完成傳統有性雜交不能完成的基因重新組合，並再生植株，經由此技術培育成的新品種可能會展現於地球，讓我們大家共同努力。

參 考 文 獻

1. 陳文輝、劉明欽　1986　原生質體培養與其在作物改良上之應用　中華農學會報　新第134期　24-46。
2. 陳文輝　1988　園藝作物組織培養應用研討會專刊 (印刷中)。